

## **LONG-TEAM CELL CULTURE**

**Patent number:** JP5123168

**Publication date:** 1993-05-21

**Inventor:** AKAZAWA OSAMU; others: 03

**Applicant:** GREEN CROSS CORP:THE

**Classification:**

- **International:** C12N5/06; C12M1/02; C12M1/04; C12M3/00; C12N5/08

- **European:**

**Application number:** JP19910314111 19911030

### **Abstract of JP5123168**

**PURPOSE:** To enable long-term culture over 3 months to several years by using a cell culture equipment not containing an electrode in the culture tank and not equipped with mobile component except a stirrer and non-prolifically culturing cells.

**CONSTITUTION:** The objective long-term cell culture is carried out by using a cell culture equipment not containing an electrode in the culture tank and not equipped with mobile component except a stirrer and non-prolifically culturing cells. In addition, as the conditions for the non-prolific cell culture, a serum-free medium is used as the culture medium and periphytic cells are preferably used as the cells. Aeration into the liquid phase is preferably carried out in a mildly foaming state.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-123168

(43)公開日 平成5年(1993)5月21日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/06				
C 1 2 M 1/02	A	2104-4B		
1/04		2104-4B		
3/00	A	2104-4B		
		7236-4B		
			C 1 2 N 5/00	E
審査請求 未請求 請求項の数3(全 6 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平3-314111

(22)出願日 平成3年(1991)10月30日

(71)出願人 000137764

株式会社ミドリ十字

大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

(72)発明者 赤澤 修

大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号  
株式会社ミドリ十字都島工場内

(72)発明者 服部 眞次

大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号  
株式会社ミドリ十字都島工場内

(72)発明者 筒井 栄三

大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号  
株式会社ミドリ十字都島工場内

(74)代理人 弁理士 高島 一

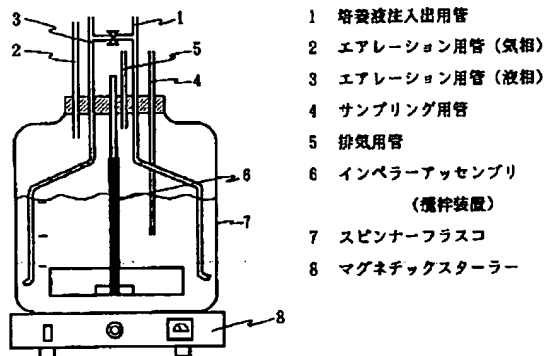
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞長期培養方法

(57)【要約】

【構成】 培養容器内に電極を持たず、可動部分が攪拌装置のみである細胞培養装置を使用して、細胞を非増殖的に培養することを特徴とする細胞長期培養方法に関する。当該培養方法においては、細胞の非増殖的培養条件が培地として無血清培地を使用し、且つ細胞として付着性細胞を使用することを特徴とし、液相へ緩やかな発泡状態にて通気を行う。

【効果】 本発明の培養方法により、長期間にわたって安定な細胞培養が可能となる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養容器内に電極を持たず、可動部分が攪拌装置のみである細胞培養装置を使用して、細胞を非増殖的に培養することを特徴とする細胞長期培養方法。

【請求項2】 細胞の非増殖的培養条件が培地として無血清培地を使用し、且つ細胞として付着性細胞を使用することを特徴とする請求項1記載の細胞長期培養方法。

【請求項3】 液相へ緩和な発泡状態にて通気を行うことを特徴とする請求項2記載の細胞長期培養方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、長期間の、就中、3ヵ月以上～数年間におよぶ培養が可能な細胞長期培養方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 大量の細胞を長期間にわたって安定に培養することは、近年各種の生化学上、医学上および製薬上重要な手法となってきた。特に、ヒト胎児腎由来株化細胞によるプロウロキナーゼの生産、CHO細胞による生理活性物質の生産等、細胞培養による有用医薬の生産にとってきわめて重要な手法となっている。

【0003】 しかしながら、通常の培養装置においては、培養槽内に昇温および恒温維持のための電極、消泡電極、pH電極、溶存酸素電極、酸化還元電極等の電極類が存在し、これらの電極への蛋白の付着、雑菌汚染、内部液の消失による電極の劣化などが発生しやすい。従って、少なくとも3～6ヵ月の間隔でそれらの取替えが必要となり、培養を中断しなければならない。

【0004】 また、培養槽、就中、通気攪拌槽は、攪拌装置に加え、温度、pH、溶存酸素等の測定のためのセンサー類、pHや溶存酸素などを一定に維持するための制御装置などが加わり、その内部構造が複雑であるため、これらが蛋白の付着等によって汚染されるので、その洗浄のために培養を中断しなければならず、この点でも長期培養が不可能となる。

【0005】 さらに、血清培地を使用すると発泡が起こるため、機械的に破泡するための装置や、消泡電極と消泡剤の自動添加装置を付置する必要があるが、これらも蛋白の付着等によって汚染されるので、その洗浄のために培養を中断しなければならない。また、発泡をなくするために、気相への通気のみを行った場合には、液相への溶存酸素量が不十分となり、細胞の培養に重大な影響を与えることとなる。従って、液相への通気を行うことが好ましいが、この通気を行うためのチューブも蛋白の付着等によって汚染される。

【0006】 かかる事情により、1年以上の長期培養を安定に行うことを報告した例は知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の課題は、長期間にわたって安定に細胞を培養可能な培養方法

を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 上記課題は、本発明、即ち以下の発明によって達成される。

①培養容器内に電極を持たず、可動部分が攪拌装置のみである細胞培養装置を使用して、細胞を非増殖的に培養することを特徴とする細胞長期培養方法。

②細胞の非増殖的培養条件が培地として無血清培地を使用し、且つ細胞として付着性細胞を使用することを特徴とする上記①記載の細胞長期培養方法。

③液相へ緩和な発泡状態にて通気を行うことを特徴とする上記②記載の細胞長期培養方法。

【0009】 (1) 本発明の培養方法に使用する装置システムを以下に説明する。

## (1) 培養容器

本発明の培養容器に使用される材質としては、ガラス(バイレックス)、ステンレス等が例示される。培養容器の容量としては、十～数千リットルのものを使用し、培養液量は培養器容量の約半量使用することが好ましい。培養容器には、培養液注入出用管、エアレーション用管(気相)、エアレーション用管(液相)、サンプリング用管、排気用管、インペラーアッセンブリ(攪拌装置)を装着する。本発明の培養装置組立て図を図1に示す。

## 【0010】 (2) エアレーション

エアレーションラインは、大量培養を行う時、培養液中の溶存酸素量及びCO<sub>2</sub>濃度を一定に保ち、細胞の増殖性を高めるのに必須な装置である。エアレーションに用いるガス組成としては、N<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>、空気などが例示され、本ガスは除菌濾過フィルターを通過させ、完全無菌ガスとして使用する。エアレーションの条件は、例えば40L容の培養容器の場合、気相に約0ml/min～1000ml/min、好ましくは約500ml/min、液相に0ml/min～1000ml/min、好ましくは約400ml/minの流量を保って通気するよう流量計のバルブを調整する。本発明の培養装置に係わるエアレーションシステムの概略を図2に示す。

## 【0011】 (3) 加温装置

加温装置には、恒温水槽、ベルトヒーター、ジャケットシステム等がある。例えば、恒温水槽は、長期間連続して培養液を36～37℃(30～40℃に設定可能)に正確に保つ装置であり、使用する加温器は恒温水槽を長期間温度制御(36～37℃)出来ると共に、攪拌が行えるものである。恒温水槽は、使用する培養容器に合わせ、アクリル樹脂またはステンレス製のものを使用する。恒温水槽は過熱と過冷を防ぐため、加温器には、サーミスターを、恒温水槽には温度センサーを取り付け警報器と連結させる。マグネチックスターラー(20～25rpmに維持)、加温器、恒温水槽、サーモポンプを図3に示すように、スピナー台上に設置する。

3

【0012】(II) 本発明の培養方法を以下に説明する。

【0013】本発明においては、通常無血清培地が使用されるが、当該培地の例としては、ダルベッコの変法イーグル培地(DME)、Waymouth's MB 752/1、Medium 199 (Gibco 社製)を基本に微量のヒト血清アルブミン、トランスフェリン、インシュリン等の血清成分及びbFGF等の増殖因子を加えたものが使用される。市販品としては、ASF301(RITC 8076) (味の素(株)製)が例示される。なお、本発明にいう無血清培地とは、全く血清のない培地のみならず、実質的に無血清の培地をも包含するものである。ここに実質的に無血清の培地とは、培養に影響を及ぼさない発泡しかおこらない程度に血清を含むものをも包含するものである。

【0014】本発明において、使用される付着性細胞とは、適当な担体に付着して単層状に細胞層を形成しなければ増殖できない、いわゆる接着依存性細胞である。接着依存性細胞では、その接着面積を多くするような工夫が必要である。代表的な例としては、緩い攪拌下でも培養液中に浮遊する程度の比重をもつ微小な樹脂性ビーズ(マイクロキャリア)の表面に細胞を接着させる方法がある。かかる付着性細胞の例としては、ヒト胎児腎由来株化細胞、チャイニーズハムスターオバリー細胞(CHO細胞)、ヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞等が例示される。

【0015】付着性細胞の接着に用いるマイクロキャリアビーズは、培養液1L当たり3~10g量を予め培養容器に入れておく。付着は通常一般的に行われている方法、すなわち細胞とマイクロキャリアビーズをスピナーフラスコの中に入れ、少量の培養液中で攪拌、静置の操作を数回繰り返すことにより行われる。

【0016】

【発明の効果】本発明の培養方法は、培養容器内に電極等を持たず、培養容器内部構造が簡単であるので、培養容器内の装置への蛋白等の付着が極めて少なく、雑菌汚染されにくいので、長期間にわたって培養を中断するような洗浄を行う必要がない。従って、本発明の方法によれば、培養容器の洗浄のために培養の途中で培養を中断する必要がない。また、無血清培地と付着性細胞との組み合わせにより、細胞の非増殖性条件下で細胞培養が行

4

われるため細胞数が一定であるので、培養条件の変更などのコントロールを行う必要がない。さらには液相へ緩やかな発泡状態にて通気を行うことによって通気チューブへの蛋白等の付着が極めて少なくなる。以上のことから、本発明においては一度培養条件を特定すればその条件を保つことで十分であり、且つ培養装置について培養を中断するような洗浄を必要としないので、長期にわたって培養を行うことが可能である。よって、本発明の培養方法により、5ヵ月以上~数年、例えば3年という長期にわたる培養が可能となる。

【0017】

【実施例】

実施例1

(1) 増殖培養

製造用のバンク細胞(ヒト胎児腎由来株化細胞、 $3.2 \times 10^6$  cells/10L スピナー)を、牛胎児血清(以下、FCS)を1~10(v/v)%の割合で添加したウェイマス培養液を用いて36~37℃で培養して増殖させた後、あらかじめマイクロキャリアビーズを入れておいた製造用スピナーフラスコの中で、同じ培養液を用い、36~37℃で攪拌培養して更に増殖させて増殖培養を終了する。

(2) 生産培養

増殖培養を終了した製造用スピナーフラスコについて、FCSの代わりにヒト血清アルブミンを0.01~0.2(w/v)%となるように添加したウェイマス培養液と交換し、以後2~3日毎に培養上清の約3/4量を同培養液と交換し、培養液中に生産させたプロウロキナーゼを得る。その産生量は80U/ml(ウロキナーゼ変換時)であった。培養は3年以上可能であった。本培養期間中における細胞数の推移の一例を、図4に示した。

【図面の簡単な説明】

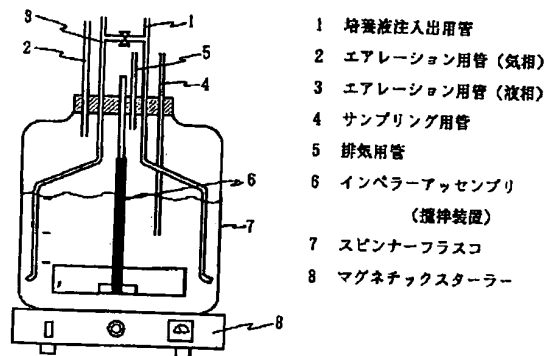
【図1】本発明の培養装置組立て図を示す。

【図2】本発明の培養装置に係わるエアレーションシステムの概略を示す。

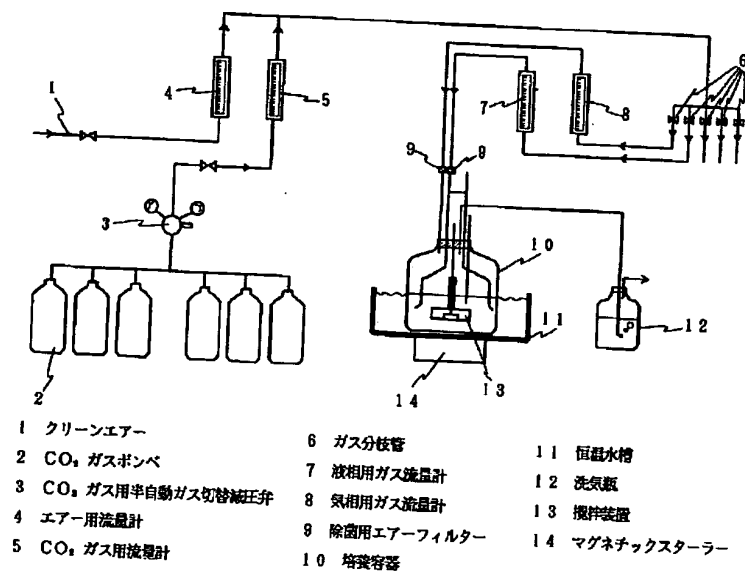
【図3】本発明の培養装置に係わる恒温水槽の概略図を示す。

【図4】細胞培養期間中における細胞数の推移の一例を示す。

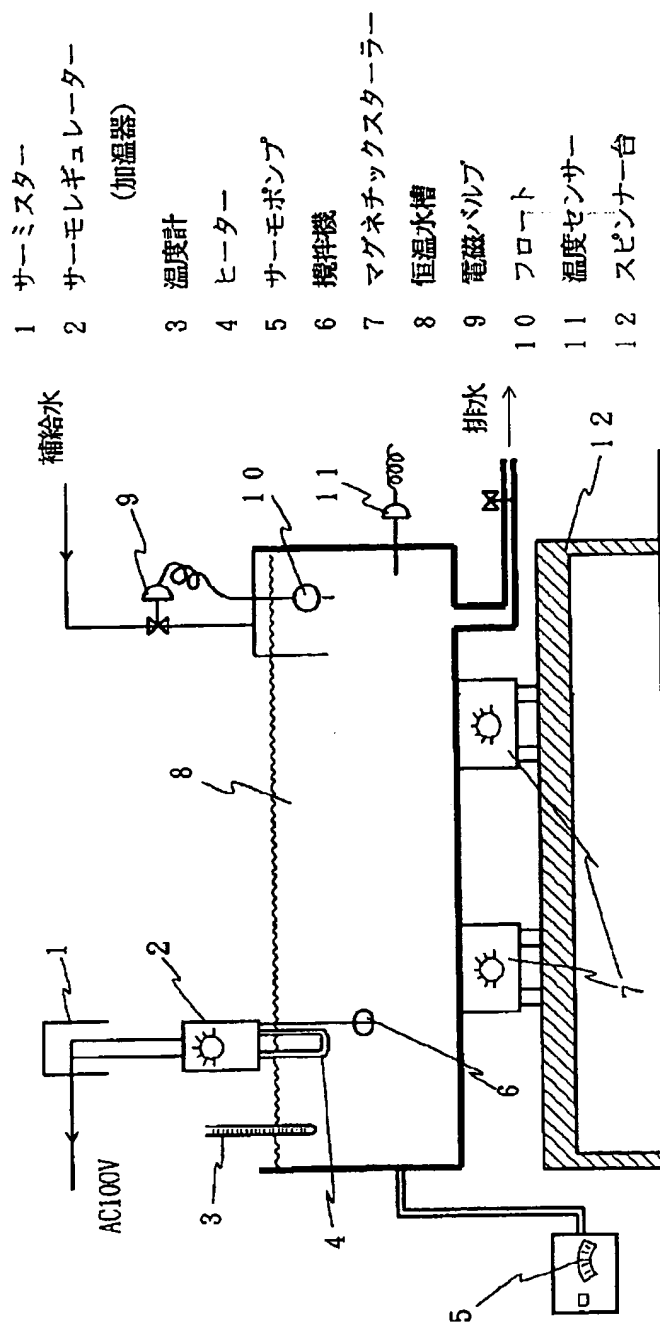
【図1】



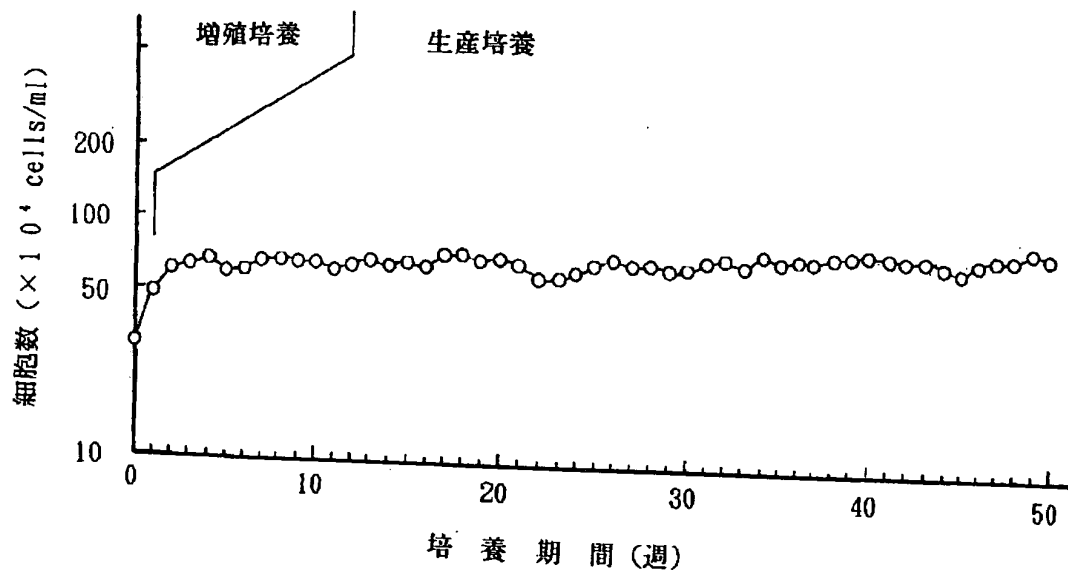
【図2】



【図3】



【図4】



スピナー・フラスコ中での細胞数の推移の一例

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

C12N 5/08

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 有村 博文

大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

株式会社ミドリ十字内